



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107709366 B

(45) 授权公告日 2021.10.26

(21) 申请号 201680036299.3
 (22) 申请日 2016.06.03
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 107709366 A
 (43) 申请公布日 2018.02.16
 (30) 优先权数据
 62/173,600 2015.06.10 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2017.12.20
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/CA2016/050631 2016.06.03
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02016/197238 EN 2016.12.15
 (73) 专利权人 干细胞技术公司
 地址 加拿大不列颠哥伦比亚省
 (72) 发明人 A·I·柯卡吉
 (74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所
 11313
 代理人 张波 戴国琛

(51) Int.Cl.
 C07K 16/46 (2006.01)
 C07K 16/00 (2006.01)
 C07K 16/28 (2006.01)
 G01N 33/53 (2006.01)
 G01N 33/543 (2006.01)
 G01N 33/566 (2006.01)

(56) 对比文件
 US 2002081635 A1, 2002.06.27
 CN 1367876 A, 2002.09.04
 CN 102067250 A, 2011.05.18
 US 6117985 A, 2000.09.12
 WO 2007109747 A2, 2007.09.27
 CN 103305462 A, 2013.09.18
 赵丽娜. 免疫磁性纳米粒子的制备及在分离 CD34+ 细胞中的应用. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库》. 2008, (第12期),

审查员 周洁

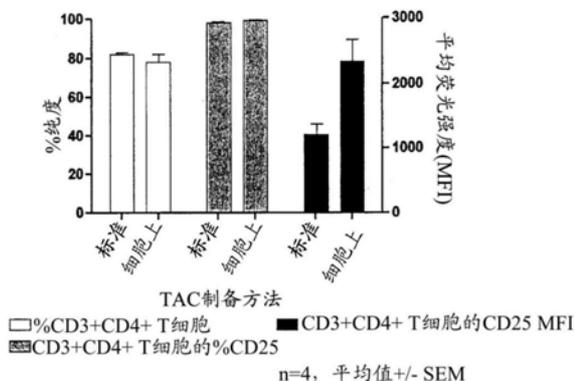
权利要求书1页 说明书10页 附图9页

(54) 发明名称

用于双功能免疫复合物的原位形成的方法

(57) 摘要

描述了一种直接在样品中的靶标实体的表面上制备四聚体抗体复合物的改进方法。具体来说,这种方法涉及使用对第一靶标实体和第二靶标实体具有特异性的抗体,在样品中将所述第一靶标实体与样品中的所述第二靶标实体连接。



1. 一种用于将样品中的第一靶标实体与第二靶标实体连接的方法,所述方法包括:
 - (a) 使所述第一靶标实体与对所述第一靶标实体具有特异性的第一抗体接触,其中所述第一抗体结合所述样品中的所述第一靶标实体;
 - (b) 将结合所述第二靶标实体的第二抗体加入到所述样品中;
 - (c) 将对所述第一抗体和第二抗体具有特异性的第三抗体以与所述第一抗体和第二抗体的等摩尔量加入到所述样品中,其中在加入到所述样品中之前所述第三抗体不与所述第一抗体或第二抗体混合并且所述第三抗体结合所述第一抗体和第二抗体的Fc部分,从而形成四聚体抗体复合物;
 - (d) 连接所述第一靶标实体和第二靶标实体,其中所述第二抗体结合所述第二靶标实体并且其中所述第二靶标实体为惰性材料或细胞。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第三抗体结合所述第一抗体和第二抗体的Fc部分。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述第一靶标实体选自自由以下组成的组:细菌、病毒、细胞器、蛋白质和核酸。
4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述第一靶标实体为细胞。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述第一抗体处于第一抗体组合中,所述第一抗体组合包含对所述靶标细胞上的一种或多种抗原具有特异性的抗体。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述第一抗体组合包含对选自自由以下组成的组的一种或多种抗原的组合具有特异性的抗体:CD2、CD3、CD4、CD8、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD25、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD43、CD45、CD56、CD61、CD66b、CD123、CD127、CD138、 α/β TCR、 γ/δ TCR和HLA-DR。
7. 根据权利要求4所述的方法,其中所述第一靶标实体为T细胞。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述T细胞为CD25⁺细胞。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第二靶标实体为颗粒或珠粒。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述第二抗体结合所述颗粒或珠粒上的PEG或葡聚糖。
11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述颗粒是磁性的。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述磁性标记的细胞被放置在具有足够强度的磁场中以将所述磁性标记的细胞与非磁性标记的细胞分离。
13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第二靶标实体是所述样品中存在的红血球。
14. 根据权利要求1所述的方法,其还包括(e)从所述样品中去除与所述第二靶标实体连接的所述第一靶标实体。

用于双功能免疫复合物的原位形成的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本专利合作条约申请根据美国法典第35篇第119条(e)款要求2015年6月10日提交的美国临时申请号62/173,600的权益,所述临时申请以引用的方式整体并入本文。

[0003] 领域

[0004] 本公开涉及用于直接在样品中的靶标实体的表面上制备四聚体抗体复合物而不是在将双功能免疫复合物加入到样品中之前制备所述双功能免疫复合物的方法和试剂盒。

[0005] 背景

[0006] 生物靶标(诸如分子、DNA、蛋白质或细胞)的特定标记是生命科学和医学领域中许多不同应用所需的。标记提供了使用标记的新功能或物理特性(荧光、磁性、密度、酶活性、放射性等)从复杂生物样品内检测或操纵靶标的灵敏方式。例如,任何生物活性药物对生物靶标的抗体介导靶向可以增加药物的效能和功效,同时减少对周围细胞和组织的毒性。

[0007] 抗体和重组蛋白的使用已用来特异性标记多种应用的生物靶标。这些方法中的大多数是出于表征、表型或分离的目的来鉴定靶标实体。抗体用于分离生物实体的用途被认为是免疫亲和纯化。

[0008] 在许多应用中,需要富集或替代地耗尽生物样品中的某些靶标实体群体。例如,从外周血、骨髓、脾脏、胸腺和胎肝分离特定的细胞类型是血液学、免疫学和肿瘤学领域的研究以及某些恶性肿瘤和免疫病症的诊断和疗法的关键。从这些异质样品中分离特定的细胞类型是这些领域的研究,某些恶性肿瘤和免疫/造血病症的诊断和疗法的关键。

[0009] 造血细胞和免疫细胞已经基于物理特征(诸如密度)并基于对杀死循环细胞的某些药剂的敏感性来分离。针对细胞表面抗原的单克隆抗体的出现极大地扩展了区分和分离不同细胞类型的潜能。存在两种基本概念方法以使用单克隆抗体从血液和相关细胞混悬液中分离细胞群体。它们的不同之处在于用抗体区别/标记的是所需细胞还是不需要的细胞。

[0010] 在阳性选择技术中,用抗体标记所需细胞并且将其从剩余的未标记/不期望的细胞中去除。在阴性选择中,标记并去除不期望的细胞。抗体/补体处理和免疫毒素的使用是阴性选择技术,但是FACS分选和大多数分批免疫吸附技术可以适用于阳性选择和阴性选择。

[0011] 四聚体抗体复合物(TAC)已广泛用于开发来自各种组织类型的众多免疫亲和细胞分离、阳性选择和阴性选择方法。TAC是第一动物物种的两种抗体(例如,小鼠抗体)的免疫复合物,所述抗体已经与第二动物物种的针对第一动物物种的抗体的Fc片段的两种单克隆抗体(例如,大鼠单克隆抗体)缀合以形成环状四聚体。在Peter M.Lansdorp的美国专利号4,868,109中已描述了制备TAC的过程。可通过将能够与磁性颗粒表面上的至少一种抗原结合的第一单克隆抗体和与靶标实体结合的第二单克隆抗体混合来制备TAC。第一单克隆抗体和第二单克隆抗体来自第一动物物种。第一抗体和第二抗体与约等摩尔量的针对第一动物物种的抗体的Fc片段的第二动物物种的单克隆抗体反应。第一抗体和第二抗体还可与约等摩尔量的针对第一动物物种的抗体的Fc片段的第二动物物种的单克隆抗体的F(ab')₂片段反应。这导致形成单特异性和双功能TAC的混合物,后者是含有第一动物物种的两种不同

抗体的TAC。

[0012] 双功能TAC对于它们将主要实体(诸如由给定细胞表达的抗原)交联至次要实体(诸如磁性颗粒)的能力是所需的。美国专利申请号US2006/0024824A1描述了一种用于在不需从磁场梯度去除容器的情况下从包含在所述容器中的样品中的非靶标实体分离靶标实体的方法,并且示出了在磁性标记之后如何将TAC与EasySep™技术一起用于分离细胞的实例。另一个潜在的次要靶标可能是红细胞,导致免疫玫瑰花结(immunorosette)的形成。美国专利号US6,448,075 B1描述了一种使用免疫玫瑰花结分离细胞的方法,其涉及使样品与至少一种与有待分离的有核细胞上的抗原结合的抗体接触,所述抗原直接或间接地与结合红血球(即红细胞)的至少一种抗体连接。这导致有核细胞和红血球的免疫玫瑰花结的形成,然后可以从样品中去除所述免疫玫瑰花结。此方法用于例如RosetteSep™阴性选择方案,其中所需细胞不形成免疫玫瑰花结,并且因此在免疫玫瑰花结被去除时仍然在样品中。

[0013] 对在细胞表面上表达的给定抗原具有特异性的单特异性TAC的存在可能潜在地减少功能性双功能TAC的可用表位以结合细胞并将细胞交联到次要实体。由于这个原因,反应产物中双功能复合物与两种单特异性复合物之间的比例可以通过改变所用第一动物物种的抗体的摩尔比而受到影响。例如,抗体比率可有所偏差以对于第二靶标实体更具特异性,使得虽然形成了更少的双功能TAC和更少的针对主要靶标实体的单特异性TAC,但是针对次要靶标实体的单特异性TAC的比例增加。

[0014] 制备TAC的当前现有技术方法是将抗体混合在水性缓冲液中。TAC一旦形成,就与主要靶标实体混合,并且随后与次要靶标实体混合。这导致双功能TAC首先结合主要靶标实体,并且然后交联到次要靶标实体。这种方法已被充分用于多种应用,诸如EasySep™和RosetteSep™技术。

[0015] 概述

[0016] 本发明涉及一种用于直接在水性样品中的靶标实体的表面上制备双功能四聚体抗体复合物(TAC)而不是在将双功能TAC加入到所述样品中之前制备所述双功能TAC的意料不到的且改进的方法。

[0017] 这种新方法是意料不到的,因为当前现有技术方法只是描述了在将TAC加入到靶标实体之前单独地形成TAC。这种新方法为现有技术方法提供了几个优点,因为(a)它提供了选择性分离具有高靶标抗原表达的靶标实体的能力,和(b)储存的单个抗体比TAC更稳定,并且因此可以在低温或冻干下较长期储存。

[0018] 制备TAC复合物的当前现有技术方法是将抗体在水性缓冲液中混合。为了优先形成双功能TAC复合物,加入摩尔比1:1:2的分别针对第一靶标实体、第二靶标实体和交联抗体的抗体。TAC的预测结果是25%主要<>主要:50%主要<>次要:25%次要<>次要。TAC复合物一旦形成,就用来标记第一靶标实体。使用这种方法,标记的靶标实体随后与次要靶标实体混合,从而允许与第一靶标实体结合的双功能TAC结合其第二靶标实体。

[0019] 本文所述的改进的方法不仅是意料不到的,而且还提供了性能改进。抗体结合动力学将表明大部分抗体复合物将在溶液中形成,并且在主要靶标实体上形成双功能TAC复合物将受到限制。所发现的是使用这种方法以更高纯度分离了细胞。这种方法为现有技术方法提供了几个优点,因为它可以选择性分离具有高靶标抗原表达的靶标实体,并且其次单个抗体由于聚集而比免疫复合物更稳定并且因此可较长期储存。

[0020] 在一个实施方案中,公开了一种用于将样品中的第一靶标实体与第二靶标实体连接的方法,所述方法包括:

[0021] (a) 使第一靶标实体与对第一靶标实体具有特异性的第一抗体接触,其中第一抗体结合样品中的第一靶标实体;

[0022] (b) 将结合第二靶标实体的第二抗体加入到样品中;

[0023] (c) 将对第一抗体和第二抗体具有特异性的第三抗体加入到样品中,其中第三抗体结合所述第一抗体和第二抗体,从而形成四聚体抗体复合物;

[0024] (d) 加入第二靶标实体,其中第二抗体结合第二靶标实体,从而通过四聚体抗体复合物连接第一靶标实体和第二靶标实体。

[0025] 第一靶标实体优选为希望从样品分离的生物材料,所述第一靶标实体诸如细胞、细菌、病毒、细胞器、蛋白质或核酸。

[0026] 在一个实施方案中,第一靶标实体是细胞,其包括但不限于T细胞、B细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、祖细胞、干细胞和肿瘤细胞。

[0027] 第二靶标实体优选为惰性材料或细胞。在一个实施方案中,惰性材料选自颗粒或珠粒。在另一个实施方案中,细胞为红细胞。

[0028] 通过以下详细描述,本公开的其他特征和优点将变得显而易见。然而,应理解的是,虽然详细描述和具体实施例示出本公开的优选实施方案,但它们仅通过说明的方式给出,因为从此详细描述中,本公开的精神和范围内的各种改变和修改对于本领域技术人员而言将变得显而易见。

[0029] 附图简述

[0030] 现将结合附图来描述本公开,附图中:

[0031] 图1示出了与EasySep™人CD25阳性选择的标准方法相比的细胞上TAC形成;

[0032] 图2示出了与EasySep™人CD25阳性选择接着颗粒释放和EasySep™CD4+T细胞阴性富集的标准方法相比的细胞上TAC形成;

[0033] 图3示出了针对从PBMC进行EasySep™阴性富集的细胞上TAC形成;

[0034] 图4示出了针对从全血进行RosetteSep™阴性富集的细胞上TAC形成;

[0035] 图5示出了标准TAC组合物和使用方法;

[0036] 图6示出了细胞上TAC形成方法;

[0037] 图7示出了细胞上TAC形成方法及其用于EasySep™阳性选择的用途;

[0038] 图8示出了使用多种靶抗体时的细胞上TAC形成方法和用途;

[0039] 图9示出了细胞上TAC形成方法及其用于EasySep™阴性富集的用途;

[0040] 图10示出了细胞上TAC形成方法及其用于RosetteSep™阴性富集的用途。

[0041] 详细描述

[0042] (I) 定义

[0043] 如本文所用,术语“抗体”包括单克隆抗体和多克隆抗体、抗体片段(例如Fab和Fab')₂、嵌合抗体、双功能或双特异性抗体。如果抗体以例如大于或等于 10^7M^{-1} 的适当亲和力(缔合常数)结合,则抗体被理解为对诸如细胞或红细胞的靶标的表面上的选定抗原具有反应性。

[0044] 如本文所用,术语“抗体组合物”是指包含多于一种类型的抗体的组合物,每种抗

体与不同的抗原结合。

[0045] 如本文所用,术语“抗原”是可以被抗体识别的实体。

[0046] 如本文所用,术语“四聚体抗体复合物”或“TAC”是包含由来自第一动物物种的两种抗体的复合物,这两种抗体由来自第二动物物种的结合第一动物物种的所述两种抗体的两种抗体保持在四聚体阵列中。

[0047] 如本文所用,术语“靶标实体”是将结合特异性抗体的目标实体,在本文中通常称为“第一抗体”。

[0048] (II) 方法

[0049] 本公开涉及用于直接在样品中的靶标实体的表面上制备四聚体抗体复合物而不是在将四聚体抗体复合物加入到样品中之前制备所述四聚体抗体复合物的方法。

[0050] 在一个实施方案中,公开了一种用于将样品中的第一靶标实体与第二靶标实体连接的方法,所述方法包括:

[0051] (a) 使第一靶标实体与对第一靶标实体具有特异性的第一抗体接触,其中第一抗体结合样品中的第一靶标实体;

[0052] (b) 将结合第二靶标实体的第二抗体加入到样品中;

[0053] (c) 将对第一抗体和第二抗体具有特异性的第三抗体加入到样品中,其中第三抗体结合所述第一抗体和第二抗体,从而形成四聚体抗体复合物;

[0054] (d) 加入第二靶标实体,其中第二抗体结合第二靶标实体,从而通过四聚体抗体复合物连接第一靶标实体和第二靶标实体。

[0055] 在一个实施方案中,所述方法还包括:

[0056] (e) 将与第二靶标实体结合的第一靶标实体从样品中分离。

[0057] 第一靶标实体是样品中希望靶向的任何实体并且优选为希望从样品分离的生物材料,所述第一靶标实体诸如细胞、细菌、病毒、细胞器、蛋白质或核酸。

[0058] 在一个实施方案中,第一靶标实体是细胞,其包括但不限于T细胞、B细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、祖细胞、干细胞和肿瘤细胞。

[0059] 在本发明的一方面,第一靶标实体为T细胞。在另一个实施方案中,T细胞为CD25⁺CD4⁺CD3⁺细胞。

[0060] 第一抗体是结合第一靶标实体的抗体或其片段。在细胞的情况下,第一抗体将与细胞上的表位或抗原结合。本领域已知许多细胞特异性抗原和所述抗原的抗体。本领域技术人员可以容易地获得此类抗体或使用本领域已知的技术制备此类抗体。细胞特异性抗原的实例包括但不限于CD2、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD11c、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD25、CD32、CD34、CD35、CD36、CD43、CD56、CD66b、CD123、CD127、CD138、 γ/δ TCR、SSEA-4、TRA-1-60、HLA-DR和半抗原(诸如生物素)或荧光染料(诸如FITC、PE或APC)。这些抗原的抗体容易获得。

[0061] 单克隆抗体优选用于本公开的方法中。对于有核细胞表面上的选定抗原具有特异性的单克隆抗体可使用对本领域技术人员显而易见的常规技术来容易地获得或产生。

[0062] 本公开还设想适体或嵌合抗体衍生物,即组合非人动物可变区和人恒定区的抗体分子。嵌合抗体分子可以包括例如来自小鼠、大鼠或其他物种的抗体的抗原结合结构域并具有人恒定区。已经描述过用于制备嵌合抗体的多种方法,并且所述方法可以用于制备含

有免疫球蛋白可变区的嵌合抗体,所述免疫球蛋白可变区识别分化细胞或肿瘤细胞表面上的选定抗原。

[0063] 在一个实施方案中,本公开的方法用于从样品分离细胞。

[0064] 在阳性选择方案中,所需细胞为靶标细胞。在阳性选择方案中,第一抗体组合物将含有对希望从样品分离的所需细胞具有特异性的至少一种抗体。

[0065] 在阴性选择细胞分离方案中,所需细胞不由第一抗体结合,并在去除结合与第二靶标实体连接的靶标细胞的第一抗体后保留在样品中。在阴性选择细胞分离方案中,第一抗体将对希望从样品去除的细胞具有特异性。

[0066] 在一个实施方案中,第一抗体是包含对希望从样品去除的不同细胞类型具有特异性的抗体的组合的组合物。例如,为了制备富含人T细胞的样品,可以将步骤(a)中的样品与结合非T细胞上的抗原的抗体的组合接触,所述抗原诸如CD14、CD16、CD19、CD36、CD56、CD66b、CD123和血型糖蛋白A。本领域技术人员可以容易地确定用于富集特定细胞类型的抗体的合适组合。就这一点而言,我们参考申请人的网站,它提供了许多细胞分离试剂盒(www.stemcell.com)。

[0067] 第二靶标实体优选为惰性材料或细胞。结合第二靶标实体的抗体或抗体片段可以容易地从可用来源制备或获得。

[0068] 在一个实施方案中,惰性材料选自颗粒或珠粒。在此种实施方案中,第二抗体可以结合已经附接到颗粒或珠粒的化学实体,其包括但不限于蛋白质、多糖和合成聚合物。在一个实施方案中,颗粒用聚乙二醇(PEG)或葡聚糖涂覆。在此种实施方案中,第二抗体或其片段将结合附接到颗粒的PEG或葡聚糖。在另一个实施方案中,颗粒为磁性的。本申请中公开磁性颗粒的实例包括铁磁流体、其他胶态磁性颗粒和混悬颗粒。

[0069] 在此种实施方案中,磁性标记的靶标细胞被放置在具有足够强度的磁场中以将磁性标记的细胞与非磁性标记的细胞分离。用磁性颗粒标记的细胞向磁场迁移并保持在适当的位置,允许非磁性细胞容易与用磁性颗粒标记的细胞分离。磁性分离细胞的方法在本领域中是已知的,例如在US 2006/0024824 A1中,其以引用的方式并入本文。图7(阳性选择)和图9(阴性选择)也示意性地示出了这种方法。

[0070] 在另一个实施方案中,第一靶标实体为细胞,并且第二靶标实体为样品中存在的红血球,所述样品诸如外周血、白血球衣(buffy coat)处理的血液、骨髓或白细胞分离术样品。第二抗体将结合存在于红血球上的抗原,诸如血型糖蛋白A。在此种实施方案中,形成可以与未结合细胞分离的细胞-红血球缀合物。可使用密度梯度离心或通过沉降将细胞-红血球缀合物(或免疫玫瑰花结)与未结合细胞分离。使用免疫玫瑰花结分离细胞的方法在本领域中是已知的,例如在US6,448,075中,其以引用的方式并入本文。图10中也示意性地示出这种方法。

[0071] 第三抗体是可以结合第一抗体和第二抗体以便形成四聚体抗体复合物(TAC)的抗体。在一个实施方案中,第三抗体或抗体片段结合第一抗体和第二抗体的Fc部分。在此种实施方案中,第一抗体和第二抗体来自相同的动物物种,并且第三抗体来自不同的物种。第三抗体优选为第二动物物种的针对第一动物物种的抗体的Fc片段的单克隆抗体的F(ab')₂片段。

[0072] 在另一个实施方案中,存在相等数量的第一抗体和第二抗体。在另一个实施方案

中,存在不等数量的第一抗体和第二抗体。在一个实施方案中,加入摩尔比为1:1:2的抗细胞、抗颗粒和交联抗体的消化的F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,第一抗体、第二抗体和第三抗体分别以3:1:4、2:1:3、1:2:3或1:3:4的摩尔比存在。

[0073] 在本发明的方法的一个替代实施方案中,第二抗体可以与第一抗体同时加入。在又一实施方案中,第二抗体和第三抗体可以与第一抗体同时加入,只要它们在加入到样品中之前不混合在一起形成TAC即可。所述方法的基本特征在于TAC在样品中原位形成。

[0074] (III) 试剂盒

[0075] 本公开还提供了用于将第一靶标实体与第二靶标实体连接的试剂盒。如先前所述,本公开的方法需要TAC原位形成,而不是在加入样品中之前形成。因此,在使用之前,第一抗体、第二抗体和第三抗体将不会存在于同一容器中。

[0076] 在一个实施方案中,所述试剂盒包含:

[0077] (a) 第一容器,其含有结合第一靶标实体的第一抗体或抗体组合物和结合第二靶标实体的第二抗体或抗体组合物;和

[0078] (b) 第二容器,其含有结合第一抗体和第二抗体或抗体组合物的第三抗体。

[0079] 在另一个实施方案中,所述试剂盒包含:

[0080] (a) 第一容器,其含有结合第一靶标实体的第一抗体或抗体组合物;

[0081] (a) 第二容器,其含有结合第二靶标实体的第二抗体或抗体组合物;和

[0082] (c) 第三容器,其含有结合第一抗体和第二抗体或抗体组合物的第三抗体。

[0083] 在另一个实施方案中,所述试剂盒包含:

[0084] (a) 第一容器,其含有结合第一靶标实体的第一抗体或抗体组合物、结合第二靶标实体的第二抗体或抗体组合物和非小鼠IgG1Fc受体阻断抗体;和

[0085] (b) 第二容器,其含有结合第一抗体和第二抗体或抗体组合物的第三抗体。

[0086] 所述试剂盒将优选包括用于使用试剂盒的方法(包括本文公开的方法)的说明书。试剂盒优选用于使用本文公开的方法从样品中分离细胞。

[0087] 试剂盒还可包括第二靶标实体,诸如颗粒或珠粒。

[0088] 第一抗体、第二抗体和第三抗体(或抗体组合物)如部分(II)-方法中所定义。

[0089] 第一容器和第二容器可以是可用于容纳抗体的任何容器,诸如小瓶或采血管。所述抗体可以是冻干的。

[0090] 以下非限制性实施例是对本发明的说明。

实施例

[0091] 实施例1:使用细胞上TAC形成的EasySep™免疫磁性阳性选择

[0092] 人调节性T细胞(Treg)最初表征为表达高水平的细胞表面CD25的CD3+CD4+T细胞(Human CD25+CD4+T regulatory T cells suppress naïve and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. (2001). MK Levings, R Sangregorio, MG Roncarolo. The Journal of Experimental Medicine 193: 11,1295-1302)。为了纯化Treg,必须从外周血中的异质细胞群体中分离表达高水平CD25的细胞。免疫磁性细胞分离需要使用对其给定靶标抗原具有不同亲和力的抗体,以及将超顺磁性颗粒连接到特异性抗体的方法。使用TAC和磁性颗粒的EasySep™细胞分离技术可以用

于从外周血单核细胞 (PBMC) 的异质混合物中标记并阳性地选择人CD25+细胞。表达高水平细胞表面CD25的PBMC的一部分可以使用细胞内转录因子FOXP3鉴定为Treg;而表达中等水平的细胞表面CD25的细胞可以是不表达FOXP3的非Treg的混合物,诸如记忆T细胞或最近激活的T细胞。

[0093] 为了从PBMC中分离Treg,EasySep™免疫磁性阳性细胞分离使用在加入含有靶标细胞群体的细胞混悬液之前以标准方法制备的TAC或者使用本公开所述的在靶标细胞群体表面上形成双功能TAC的方法。

[0094] 人PBMC由全人血的Ficoll®密度梯度分离或由用PBS+2%胎牛血清(FBS)+1mM乙二胺四乙酸(EDTA)洗涤的白细胞分离术样品来制备。将PBMC以 1×10^8 个细胞/mL重悬于PBS+2%FBS+1mMEDTA中。

[0095] 对人CD25和PEG具有特异性的TAC使用在磷酸盐缓冲盐水(PBS)(pH 7.4)中组合1:1:2摩尔比的抗人CD25(小鼠IgG1,10ug/mL)、抗PEG(小鼠IgG1,10ug/mL)以及F(ab')₂抗小鼠IgG1(大鼠IgG1,13.6ug/mL)和抗人CD32(小鼠IgG2a,20ug/mL)的现有技术方法来制备。将抗体混合物在37℃孵育至少30分钟、优选16-24小时,并在2-8℃下储存,直到使用,如Peter M.Lansdorp的美国专利号4,868,109所述。对于细胞上TAC方法,制备两种分开的抗体混合物。混合物组分A是在PBS pH7.4中用抗人CD25(10ug/mL)、抗PEG(10ug/mL)和抗人CD32(20ug/mL)来制备。混合物组分B是在PBS pH7.4中用13.6ug/mL的F(ab')₂抗小鼠IgG1来制备。单独制备两种抗体混合物,并在2-8℃下储存直到使用。

[0096] 对于标准的TAC细胞标记的方法,将预形成的抗CD25TAC在室温下加入到 1×10^8 个PBMC/mL混悬液中5分钟以允许预形成的TAC与细胞表面靶标结合。预形成的TAC中抗体的最终浓度为0.5ug/mL抗CD25、0.5ug/mL抗PEG、0.68ug/mL F(ab')₂抗小鼠IgG1。抗CD32抗体的最终浓度为1ug/mL。抗CD32抗体阻断抗体与表达CD32的细胞的Fc受体介导结合。

[0097] 对于细胞上TAC细胞标记方法,将最终浓度为0.5ug/mL抗CD25(c1:M-A251)、0.5ug/mL抗PEG(c1:3F12-1)和1ug/mL抗CD32(c1:IV3)的混合物组分A在室温下加入到 1×10^8 个PBMC/mL混悬液中5分钟以允许抗CD25mAb与细胞表面靶标结合。抗PEG抗体在混悬液中保持未结合。在5分钟孵育之后,加入终浓度为0.68ug/mL的F(ab')₂抗小鼠IgG1mAb(c1:P9),并在室温下孵育5分钟。

[0098] 在TAC标记步骤之后,EasySep™细胞分离程序中的后续步骤是相同的。在加入标准TAC或细胞上TAC形成方案之后,以50uL/mL加入EasySep™可释放RapidSpheres™-50200并孵育5分钟。在孵育之后,将样品用PBS+2%FBS+1mM EDTA稀释并置于EasySep™磁体中5分钟。在磁性孵育之后,将未标记的部分倒入新管中。将磁体中的管中的阳性选择样品重悬于PBS+2%FBS+1mM EDTA中,并且进行三次另外的5分钟磁性洗涤。在它们分离之后,收获细胞并使用针对CD3、CD4和CD25的抗体通过流式细胞术进行分析。

[0099] 结果

[0100] 当将相同浓度的抗体用于TAC的形成时,与TAC的标准方法(CD25 MFI=1217+/-161)相比,使用细胞上方法的TAC形成能够分离表达约2倍高水平的CD25(CD25 MFI=2339+/-332)的细胞(图1)。目标在于CD3+CD4+T细胞的纯度(对于标准方法和细胞上方法分别为81.9%+/-1.2%和77.8%+/-4.0%)和总CD25+细胞是相当的(对于标准方法和细胞上方法分别为98.0%+/-0.6%和99.0%+/-0.4%)。唯一的差别在于,细胞上TAC形成方法促进表

达更高水平的CD25的细胞的分离,如通过流式细胞术评估的荧光染料缀合的抗体染色的平均荧光强度所评估的。

[0101] 在使用标准方法或细胞上TAC形成方法对CD25+细胞进行阳性选择之后,使用如美国专利申请W02014029012A1中所述的EasySep™释放缓冲液从分离的细胞中释放磁性颗粒。随后使用EasySep™人CD4+T细胞阴性选择试剂盒耗尽不含磁性颗粒的细胞的非CD4+T细胞。在非CD4+T细胞耗尽之后,通过染色CD4、CD25和细胞内FOXP3通过流式细胞术来评估细胞的Treg纯度,所述细胞内FOXP3为Treg特异性表达的转录因子并且其表达与CD25表达线性相关。

[0102] 与制备TAC的标准方法(58.2%±3.8%)相比,使用细胞上CD25TAC形成方法分离的细胞导致了更高的最终Treg纯度(80.9%±2.0%),如通过CD4、CD25和FOXP3所评估的(图2)。这两种分离方法之间的唯一差别是CD25TAC形成和细胞标记方法,其导致最终Treg纯度的意料不到且令人惊讶的增加。与由于分离细胞群体的更高纯度而预期的细胞上TAC方法(37.4%±4.8%)相比,使用标准方法的Treg回收率更高(66.2%±7.8%)。

[0103] 综上所述,这证明了细胞上TAC形成可以提供优于用于分离表达高水平CD25的人调节性T细胞的现有预形成TAC的优点。这种方法可以用来改进对靶标抗原的不同表达水平的特异性。

[0104] 实施例2:使用细胞上TAC形成的EasySep™免疫磁性负选择

[0105] 在EasySep™阳性选择中,所需细胞用对给定细胞表面抗原具有特异性的单一TAC标记,并与剩余的未标记/不期望的细胞分开。在阴性选择中,多种不同类型的不期望的细胞被标记并去除,这需要对多种细胞表面抗原具有特异性的TAC的更复杂混合物。执行原理实验的论证以证明细胞上TAC形成的实用性,其可以用于在用于EasySep™免疫磁性阴性选择的细胞的异质混合物中标记多个靶标细胞。

[0106] 在本实施例中,人PBMC由全人血的Ficoll®密度梯度分离或由用PBS+2%FBS+1mM EDTA洗涤的分离术样品来制备。将PBMC以 5×10^7 个细胞/mL重悬于PBS+2%FBS+1mM EDTA中。与用于阳性选择的细胞上TAC方法类似,制备两种分开的抗体混合物。混合物组分A用针对取决于所需细胞群体的细胞表面标志物的组合的抗体以及识别EasySep™葡聚糖RapidSpheres™-50103的抗葡聚糖抗体来制备,所述细胞表面标志物包括:CD2、CD3、CD4、CD8、CD14、CD16、CD19、CD36、CD43、CD56、CD66b、CD123、 γ/δ TCR、HLA-DR、血型糖蛋白A。组分B用与混合物A中的总抗体含量等摩尔浓度的F(ab')₂抗小鼠IgG1来制备。单独制备两种抗体混合物,并在2-8°C下储存直到使用。

[0107] 将混合物组分A加入到 5×10^7 个PBMC/mL混悬液中,并在室温孵育5分钟以允许抗体与其给定靶标抗原结合。混合物组分A中针对细胞表面标志物的每种抗体的最终浓度在0.5-4.0ug/mL之间变化。对次要靶标实体具有特异性抗葡聚糖抗体,EasySep™葡聚糖RapidSpheres™-50103在混悬液中保持未结合。在5分钟孵育之后,加入等摩尔浓度的F(ab')₂抗小鼠IgG1mAb(c1:P9),并在室温下孵育5分钟。在5分钟孵育之后,将TAC标记的样品用PBS+2%FBS+1mM EDTA加满并立即置于EasySep™磁体中3分钟。在磁性孵育之后,将未标记的所需部分倒入新管中。收获富集的细胞群体并使用针对CD45、CD3和CD4、CD19或CD56的抗体通过流式细胞术进行分析。

[0108] 结果

[0109] 制备三种不同的抗体混合物,用于人CD3+CD4+T细胞、CD3-CD19+B细胞和CD3-CD56+天然杀伤(NK)细胞的阴性富集。每种混合物由靶向不需要的细胞群体的抗体构成。使用这种方法并靶向多个细胞表面靶标抗原,细胞上TAC形成方法意料不到地导致所需群体富集至高纯度,相当于使用传统的基于预形成TAC的方法通常所看到的。从含有35.0%经过CD45+细胞门控的CD3+CD4+T细胞的PBMC样品开始,使用基于细胞上TAC的阴性选择方法可以获得97.7%纯度的CD3+CD4+T细胞,其中所需细胞的回收率为39.7%(图3A)。从含有12.6%经过CD45+细胞门控的CD3-CD56+NK细胞的PBMC样品开始,使用基于细胞上TAC的阴性选择方法可以获得84.6%纯度的CD3-CD56+NK细胞,其中所需细胞的回收率为34.8%(图3B)。从含有7.3%经过CD45+细胞门控的CD3-CD19+B细胞的PBMC样品开始,使用基于细胞上TAC的阴性选择方法可以获得89.2%纯度的CD3-CD19+NK细胞,其中所需细胞的回收率为21.1%(图3C)。这些结果一起证明,在范围为7.3-35.0%的起始细胞频率的情况下,可以使用同时靶向多种不同细胞类型的细胞上TAC标记程序从细胞的异质混合物中富集未标记的淋巴细胞群体的有效富集。

[0110] 实施例3:使用细胞上TAC形成的RosetteSep™免疫密度阴性选择

[0111] 迄今为止的实施例已经证明了细胞上TAC形成在阳性选择和阴性选择方法中的EasySep™免疫磁性细胞分离中的实用性。在前述实施例中,在主要靶标实体上形成双功能TAC,所述主要靶标实体诸如在不存在诸如EasySep™磁性颗粒的次要实体的情况下由给定细胞表达的抗原。

[0112] 另一个潜在的次要靶标可能是存在于全血中的红细胞。美国专利号US6,448,075 B1描述了一种使用免疫玫瑰花结分离细胞的方法,其涉及使样品与至少一种与待分离的有核细胞上的抗原结合的抗体接触,所述抗原直接或间接地与结合红血球(即红细胞)的至少一种抗体连接。这导致有核细胞和红血球的免疫玫瑰花结的形成,然后可以在密度梯度介质(诸如Ficoll)上分层时从样品中去除所述免疫玫瑰花结。此方法用于例如RosetteSep™阴性选择方案,其中所需细胞不形成免疫玫瑰花结,并且因此在免疫玫瑰花结被去除时保留在样品中。RosetteSep™是一种细胞标记和分离方法,其使用将不期望的细胞与存在于全血中的红细胞交联的TAC。在本实施例中,主要靶标实体和次要靶标实体都存在于相同的起始样品中。

[0113] 作为原理的论证,在加入含有主要靶标实体和次要靶标实体的全血样品之前,将细胞上TAC形成程序与预形成的TAC进行比较。与实施例2中用于EasySep™阴性选择的细胞上TAC方法类似,制备分开的抗体混合物。混合物组分A用针对对非CD3+CD4+T细胞具有特异性的细胞表面标志物的组合的抗体来制备,所述抗体包括对CD8、CD16、CD19、CD36、CD56、CD66b和血型糖蛋白A具有特异性的抗体。组分B用与混合物A中的总抗体含量等摩尔浓度的抗小鼠IgG1来制备。单独制备两种抗体混合物,并在2-8℃下储存直到使用。

[0114] 将混合物组分A加入到全血混悬液中,并在室温孵育5分钟以允许抗体与其给定的靶标抗原结合。混合物组分A中针对细胞表面标志物的每种抗体的最终浓度在0.5-21.0ug/mL之间变化。与先前的实施例不同,混合物组分A中的所有抗体都可以与样品中它们相应的靶标抗原结合。在5分钟孵育之后,加入等摩尔浓度的抗小鼠IgG1mAb(c1:P9),并在室温下孵育5分钟。在5分钟孵育之后,TAC标记的全血样品用PBS+2%FBS加满,并在Ficoll®密度梯度上分层并离心。离心步骤之后,收获保持在水相与Ficoll®密度介质之间的界面处的细

胞,并使用针对CD45、CD3和CD4的抗体通过流式细胞术进行分析。

[0115] 结果

[0116] 使用这种方法并靶向包括主要靶标实体和次要靶标实体的多个细胞表面靶标抗原,细胞上TAC形成方法意料不到地导致免疫玫瑰花结的形成并且将所需群体随后从初始红细胞裂解的全血起始样品中的19.6% (图4A) 富集到富集样品中的CD45+CD3+CD4+T细胞的81.6%纯度,其中所需细胞的回收率为24.3% (图4B)。这等于与起始全血样品相比纯度的4.2倍增加。相比之下,预形成的TAC导致CD45+CD3+CD4+T细胞的最终纯度为95%,其中所需细胞的回收率为38.3% (图4C)。作为原理的论证,这些结果表明,细胞上TAC形成方法可以形成能够一起交联抗体靶向的有核细胞和红细胞以形成免疫玫瑰花结的TAC,但是当主要靶标实体和次要靶标实体都存在于起始样品中时将需要进一步的优化。

[0117] 虽然已经参照目前被认为是优选实施例的内容描述了本公开,但是应理解,本发明不限于所公开的实施例。相反,本公开旨在覆盖包括在所附权利要求的精神和范围内的各种修改和等同布置。

[0118] 所有公布、专利和专利申请都以全文引用的方式并入本文,就如同特定地和个别地指示将每一个别公布、专利或专利申请以全文引用的方式并入本文一般。

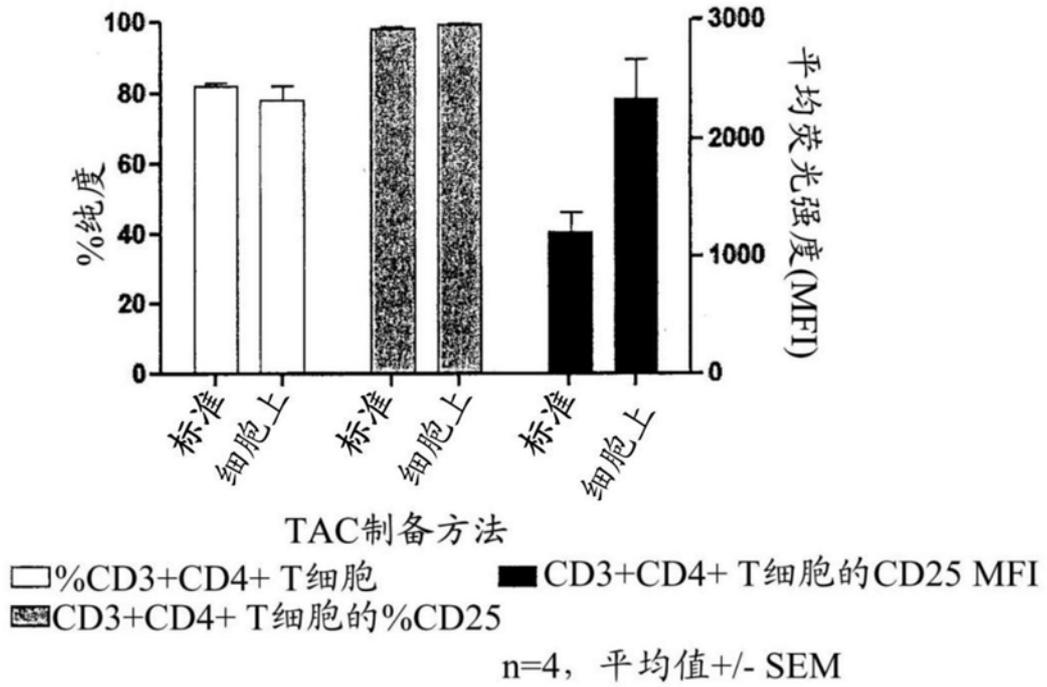


图1

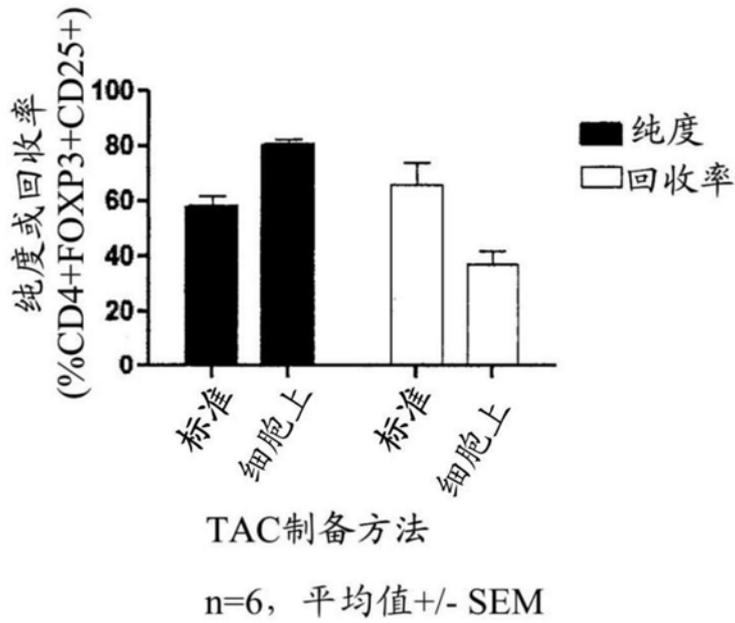


图2

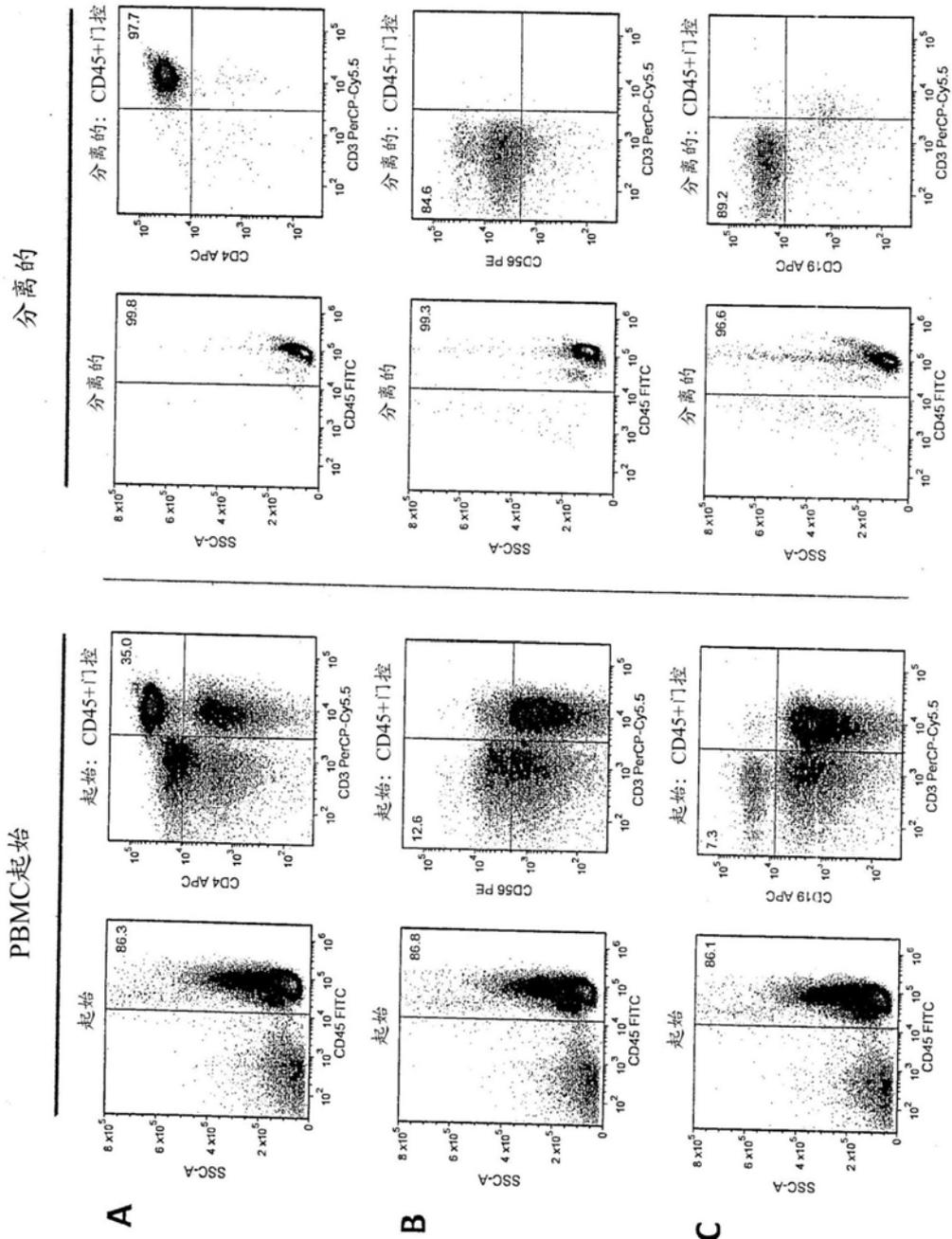


图3

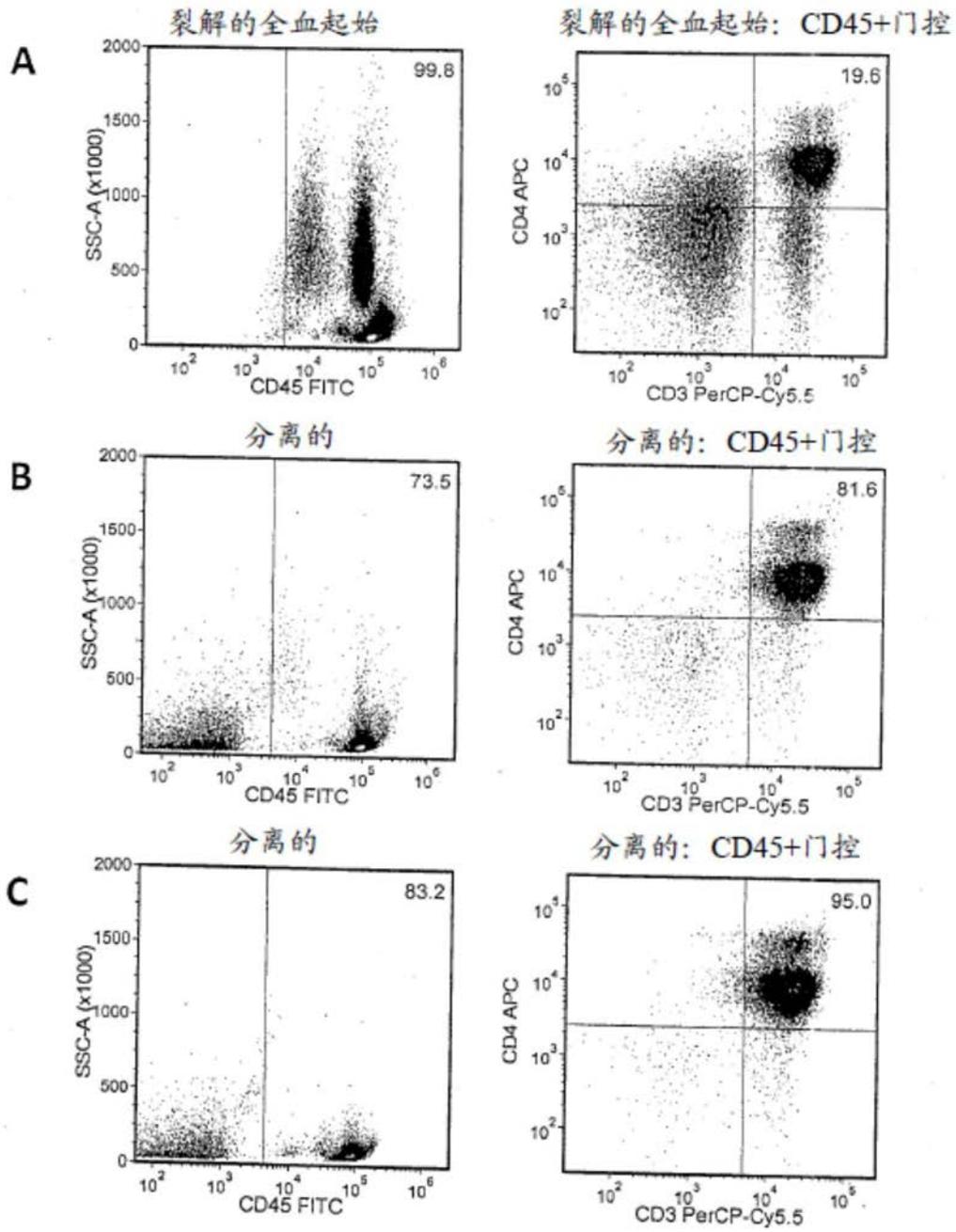


图4

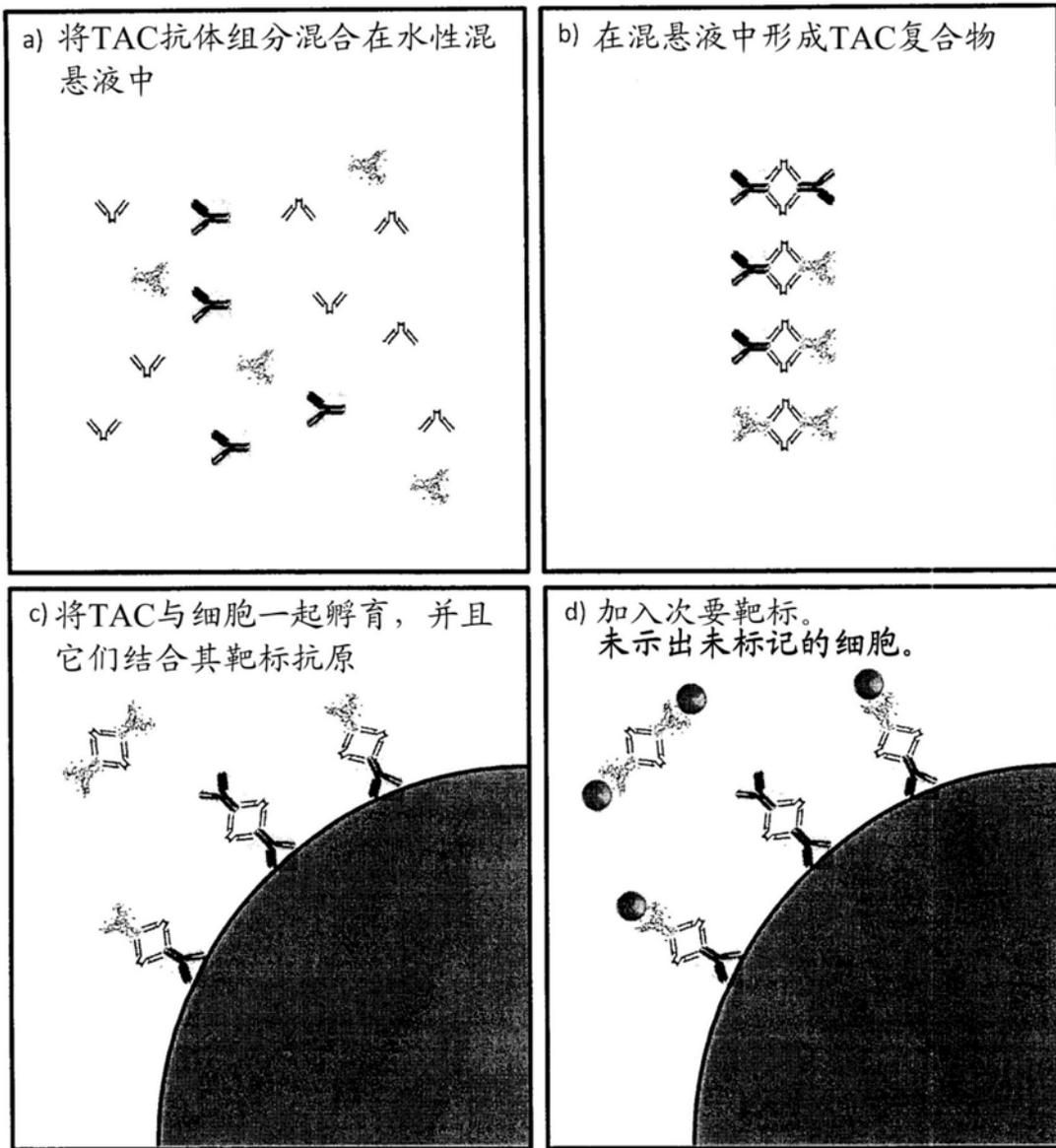


图5

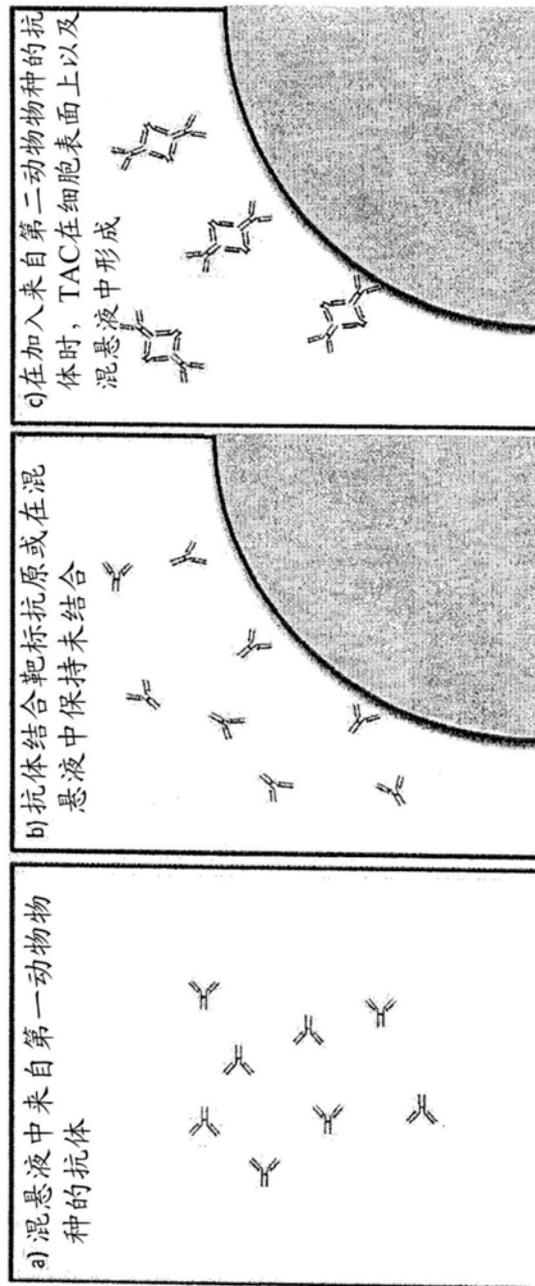


图6

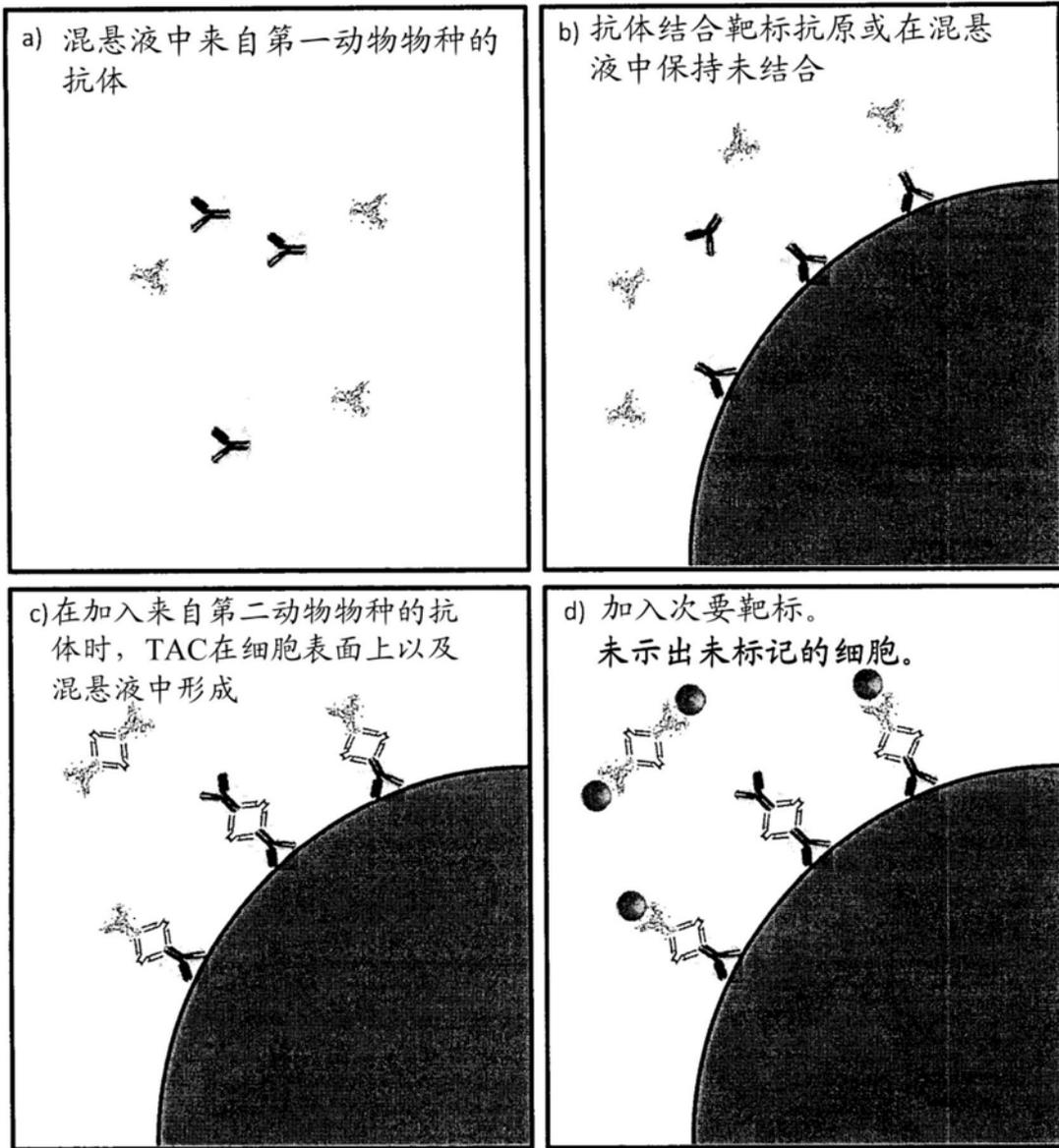


图7

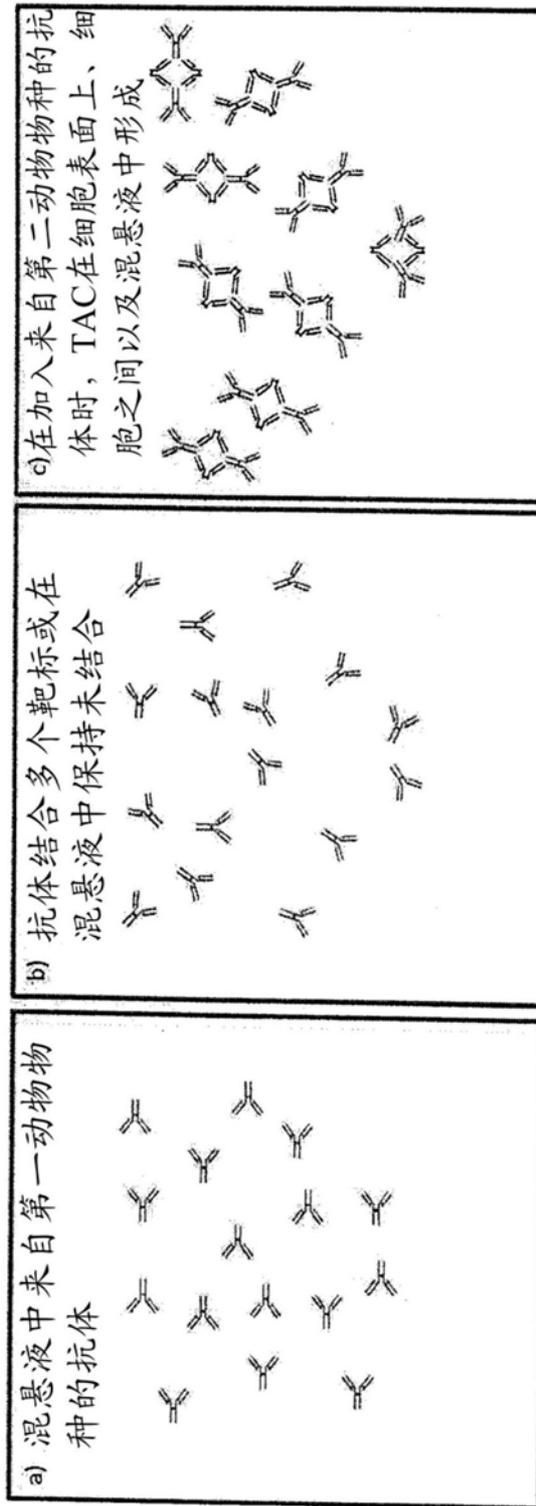


图8

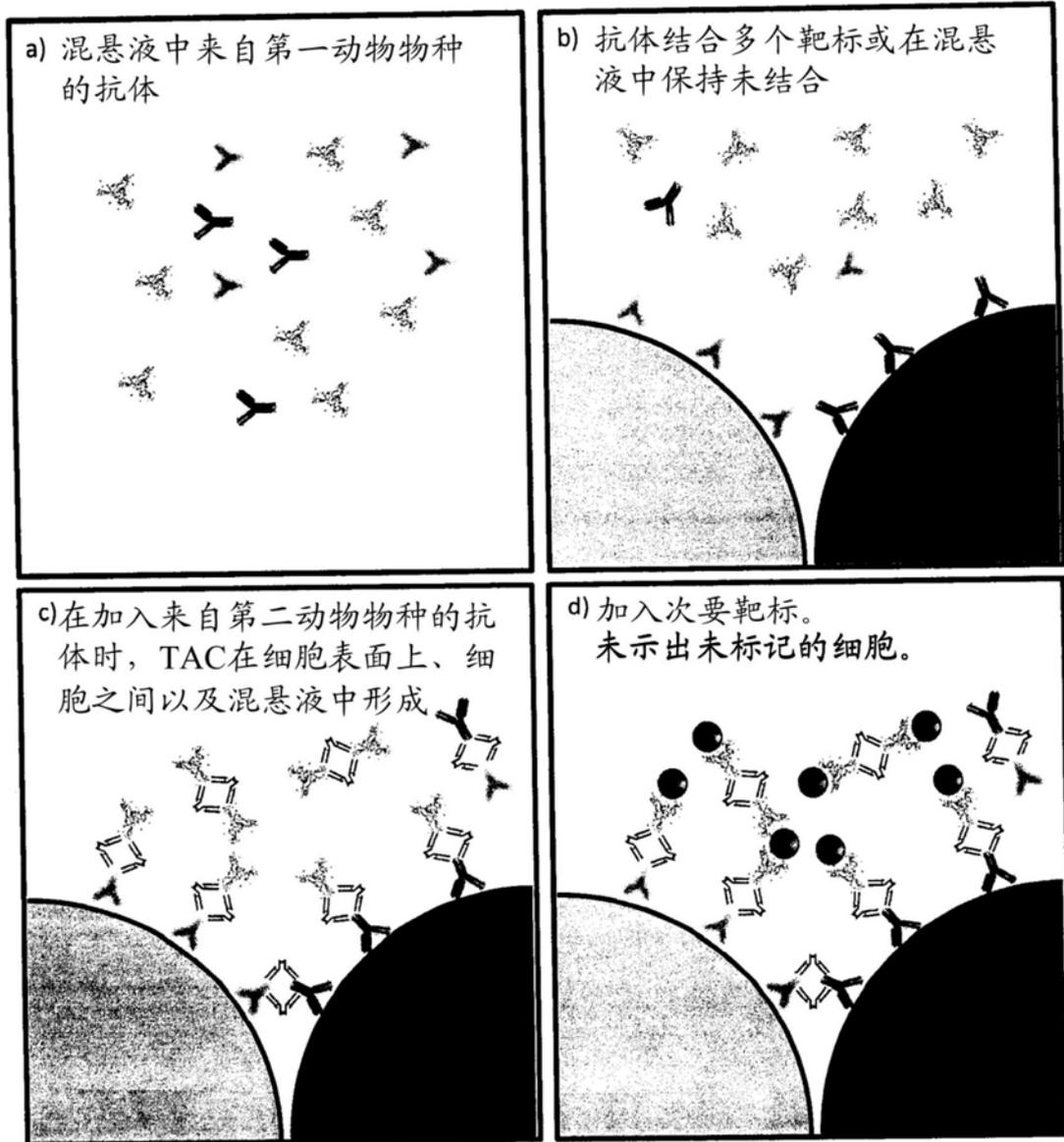


图9

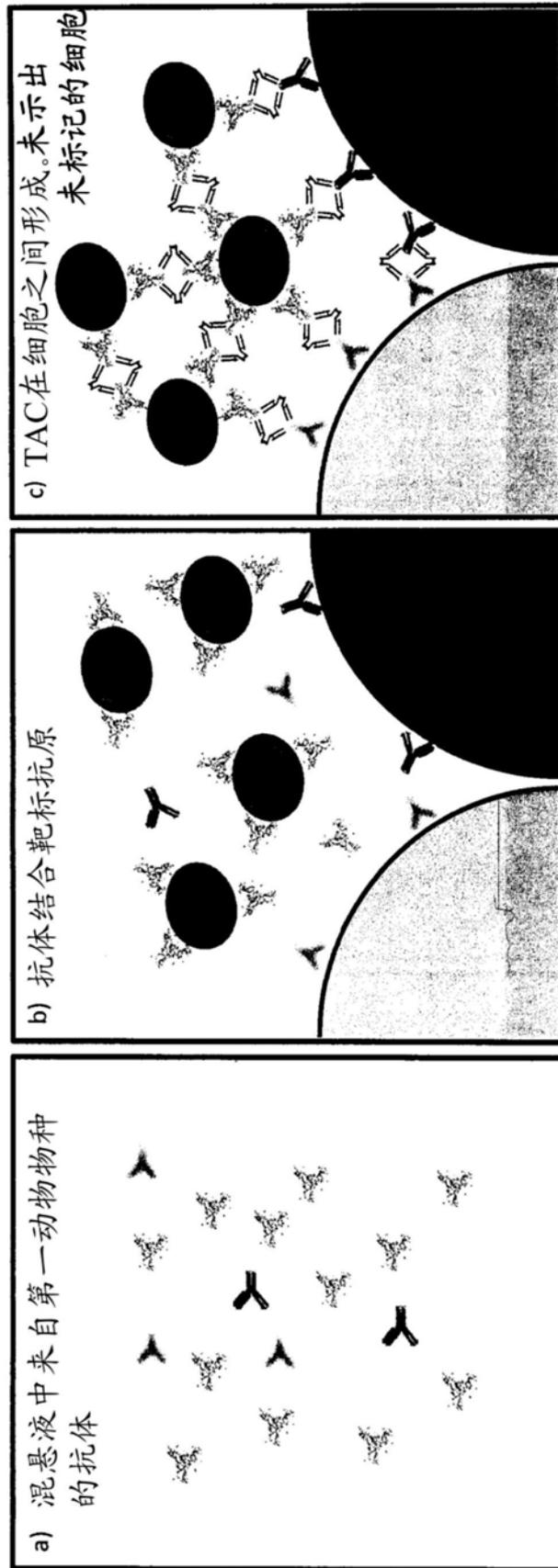


图10